第2卷第4期增刊　　动物学研究　　Vol.2, No. 4
1981年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1981

中国电鳐胆碱受体的分离及其特性

胡本荣　沈宝莲　陈克敏　吴秀荣　　张世荣
(广州中山医学院)　　(中国科学院北京动物研究所)

摘　要

从中国电鳐电器官可分离制备含丰富胆碱受体的粗膜制剂。可用来研究受体与^{125}I-神经毒的结合反应。胆碱受体激动剂、对抗剂对^{125}I-神经毒与受体的结合有竞争性抑制作用，这表明该受体为烟碱样的。该受体似含有两个结合点，其一能与胆碱受体配基相结合，另一能与阳离子相结合。受体与阳离子结合后，可抑制受体与神经毒的结合。广东蛇药同样亦能干扰受体与神经毒的结合反应。并讨论了它的作用机制。

胆碱受体分子水平的研究始于70年代初期，迄今仍不断深入和发展。目前的研究除受体的分离纯化、理化特性、生理功能等已有大量报导外，近年来还利用游离受体制成病理性的动物模型，为研究重症肌无力创造了良好的条件，亦为研究胆碱受体开拓了新的途径。

烟碱样胆碱受体 (n-AchR) 可取自多种动物的组织。其中以电鳐科双鳍电鳐属(*Narcine*)的电器官含量最高[1]。我国南海产的黑斑双鳍电鳐(*Narcine maculata*)，国内外对它的研究尚少。本文从该鱼分离提纯n-AchR并以它为工具对广东蛇药抗蛇毒作用原理进行初步探讨。

实验部分

一、电器官细胞膜的分离和制备

电鳐电器官是用以自卫和猎食的，它可发出数十伏的电压。电器官位于头部两侧，外观呈腰形、扁平状透明的胶状组织。解剖时，从腹面正中剖开皮肤，在脊柱两侧2－3厘米处即可见一大片与周围肌肉组织不同的电器官，迅速将其分离和摘出并置速冻低温冰箱中（－20°C以下）保存备用。

实验操作均在0～4°C下进行。取冰冻的电器官，待解冻后，称取500g，用氯化钠溶液洗去附在电器官表面的不洁物，剪成小块，加入含1*M* NaCl的10m*M*磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 500ml，用电动组织匀浆机（每分钟8000转）匀浆2分钟，所得匀浆液在

冷冻离心机（5,000rpm）离心10分钟，用尼龙纱绢过滤上层液，以除去结缔组织和碎片。滤液再用超速离心机（120,000×g）离心45分钟，吸去上清液，这里主要含可溶性蛋白弃去。将沉淀块混悬在含0.4*M* NaCl的10m*M*磷酸盐缓冲液125ml中，用玻璃匀浆器研磨15分钟，再用超速离心机（120,000×g）离心45分钟，吸去上清液，沉淀块再用适量的10m*M*磷酸盐缓冲液（pH7.4）混悬均匀，使每毫升混悬液相当于4～5g鲜组织，为受体膜的粗制剂，贮存低温冰箱中备用。

粗制剂经去垢剂Triton X-100（用量为总溶量的1%）搅拌3小时，使胆碱受体游离于溶液中，再用120,000×g离心45分钟，吸取上清部分，内含游离受体组分，为溶性受体膜制剂，贮于冰箱中。以上两种膜制剂均可供膜的生物活性检定用。

二、眼镜蛇神经毒为中华眼镜蛇（*Naja naja atra*）蛇毒

神经毒的分离主要参考云南动物研究所采用的方法[2]，吸附剂为Whatman厂羧甲基纤维素32，用含不同浓度的NaCl的磷酸盐缓冲液洗脱，再脱盐纯化后，聚丙酰胺园盘电泳和SDS凝胶电泳均呈一条区带。毒性比粗毒高约3倍。

三、^{125}I或^{131}I-神经毒的制备

按惯用的氯胺T方法制备同位素碘标记的神经毒，用量为无载体Na^{125}I 1～2毫居里，眼镜蛇神经毒30μg，溶于含0.2%BSA（牛血清蛋白）的10m*M*磷酸盐缓冲液中，在室温中加入氯胺T，其用量视碘源中所含还原剂的量而定，一般约用400μg，反应总体积不超过150μl。俟反应1～2分钟之后，立即加入偏亚硫酸钠约800μg使反应终止。碘化后的神经毒再经葡聚糖G-25柱层析纯化后使用。

四、受体膜制剂的蛋白含量检定

采用Hartree改良Lowry氏法[3]，以牛血清蛋白结晶（英国产）作为标准品，用国产72型分光光度计测定其含量。

五、受体膜制剂的活性检定

检测膜中受体与^{125}I-神经毒或^{131}I-神经毒的结合量。在聚苯乙稀小管中加入100μlm*M*磷酸盐缓冲液（pH7.4，内含1%牛血清蛋白）作为保护液，再加入100μl粗膜制剂及所需浓度的无标记的神经毒（一般为12.5μg/0.1ml），亦可改用胆碱受体激动剂，拮抗剂，Na^+、K^+、Li^+、Ca^{++}、Mg^{++}或广东蛇药以代替无标记蛇毒。对照管则用缓冲液代替，在18～20℃预保温30分钟，然后加入^{125}I-神经毒，再保温40～50分钟后，立即加入冰冻的缓冲液3ml终止反应，在3,000rpm离心10分钟，轻轻吸取上清液，不破坏沉淀块。按上法再加缓冲液洗涤一次，尽量吸干，贴于管底的沉淀块连同塑料管一起放入井型闪烁计数器中，记录每分钟的放射读数(cpm)。并以每管加入50μg无标记神经毒作为校正管，进行非特异性吸附校正。

cpm（结合）=cpm（样本）-cpm（非特异）

溶性受体膜制剂的结合检测方法同上，但终止反应改用20%聚乙二醇6000，0.6ml，

使之沉淀，离心后测定其放射读数（cpm）。

结　果

一、膜胆碱受体与^{125}I-神经毒的结合试验

上述方法制备的膜制剂，膜中n-AchR与^{125}I-神经毒有很高的亲和力，3 μg的粗膜蛋白即能明显地检到它们的结合量(cpm)，结合量随加入膜蛋白量增加而递升（图 1）。结合量的多少与结合试验过程中的保温时间有关，保温时间从 0 ～60分钟内是递升的，以后逐渐下降，至270分钟时已降至30%左右（图 2）。结合量与保温的温度（0°，15°，37°C）无显著影响。结合量与缓冲液的pH（pH5.8，6.8，7.4，7.8，8.5）亦未发现有显著的差异。n-AchR与^{125}I-神经毒结成复合物在一定的膜量情况下，开始是随加入的标记神经毒的量而增加，以后即出现有饱和现象，饱合结合出现以后，继续增加标记神经毒量时，放射读数再次上升，一般认为是非特异性结合增加引起的（图 3），如用纯的受体蛋白作结合试验则影响较少。

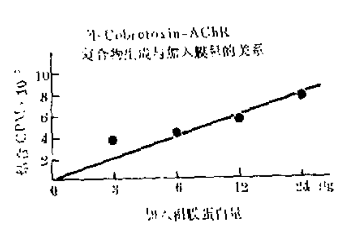


图 1

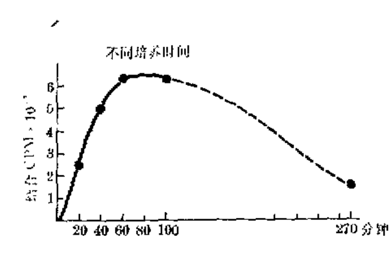


图 2

图 3

二、电器官细胞膜的n-AchR

经Triton X-100处理后，膜的n-AchR游离出来溶解于缓冲液中。这些溶性受体膜的蛋白含量根据测定结果减少了 3 ～ 4 倍（表 1），而结合的放射读数却增加为130%，说明受体的粗膜制剂经去垢剂处理后，溶性受

表 1　　电器官细胞膜量蛋白质含量的测定

膜 ＼ 毫升数 / 蛋白质含量*	0.2	0.4	0.6	0.8
粗　膜	1200	2300	/	/
溶　性　膜	400	680	850	1050

* 蛋白质含量以微克（μg）表之

体膜仍具粗膜的同样特性。纯化后的膜可以增加对神经毒的结合量，减少非特异性的吸附，从而提高分析的灵敏度。这与其他工作者如Brady[1]所得结果相似。

三、n-AchR与^{125}I-神经毒特异性结合的进一步试验

在结合试验中，先加入一定量的无标记的神经毒预保温30分钟，再加入^{125}I-神经毒，再保温40分钟，结果对照组与试验组的放射读数有显著差异。两种神经毒同样能与n-AhcR相结合。由于无标记神经毒的存在，竞争性抑制了^{125}I-神经毒与受体的结合，被抑制的程度随加入无标记神经毒的量而增加（图4）。

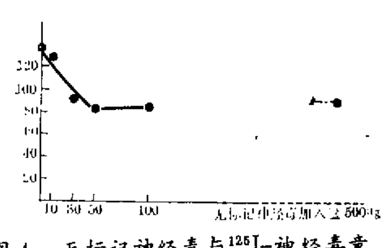


图4 无标记神经毒与^{125}I-神经毒竞争膜受体反应曲线（11万cpm）

胆碱受体激动剂如氨甲酰胆碱，胆碱受体对抗剂如筒箭毒碱同样也能抑制^{125}I-神经毒与受体的结合反应（图5、图6）。

四、广东蛇药对^{125}I-神经毒结合反应的抑制作用

广东蛇药是我们教研室多年来用作蛇伤治疗的药物。据308病例总结，它对各种含有神经毒或混合毒的蛇伤治疗，其疗效是确实的。广东蛇药对小白鼠中毒模型的治疗实验结果亦肯定该药对眼镜蛇毒、眼镜王蛇毒、银环蛇毒、蝮蛇毒中毒动物有非常显著的保护作用[4]（P值均<0.001）。广东蛇药的化学组分很多[5]，我们从其中分离出一种白色方形晶体（简称A晶），经火焰光度计分析试验和发射光谱半定量分析，该结晶主要是钾盐，伴有少量钠盐、钙盐、镁盐以及极微量的其他阳离子。A晶经初步的定量分析，结果表明含KCl95%，NaCl 4%，其它1%。

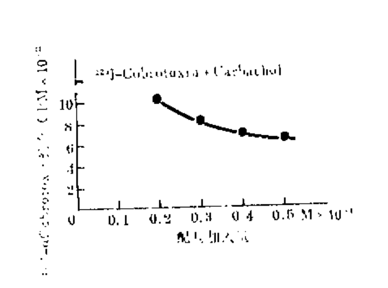


图5 不同配基与电器官膜受体的结合

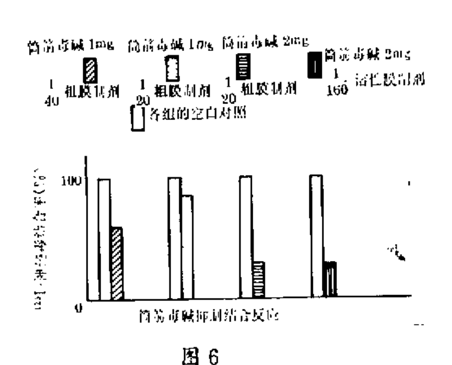


图6

6gA晶溶于0.8%西黄蓍胶溶液100ml中，0.2ml/10g体重小白鼠皮下注射，对致死量广东眼镜蛇毒（15～15.5μg/10g体重，对侧皮下注射）保护作用显著（$P<0.001$），使用外源性化学纯的KCl作同样的小白鼠保护试验，结果表明也有保护作用（$P>0.005$）。

遭神经毒或混合毒的蛇伤病人，其中毒症状主要是外周性呼吸麻痹，一般认为是呼吸肌的n-AchR与蛇毒相结合，从而阻断神经肌接头的传递，以至呼吸活动受到抑制。

为此，我们进行K^+对^{125}I-神经毒与n-AchR的结合反应是否亦有抑制作用。我们用不同浓度的（$10^{-2}M$，$10^{-1}M$和$5\times10^{-1}M$）KCl溶液代替上述实验中的无标记神经毒，与膜受体制剂在室温下预保温30分钟，再加入^{125}I-神经毒再保温40分钟，然后终止结合反应，最后在井型闪烁计数器测定放射读数。对照组用保温液代替KCl溶液，实验结果n-AchR-^{125}I-神经毒复合物的生成受到抑制，其抑制程度随加入KCl的浓度增高而加大（表2）。同样，我们再用广东蛇药注射剂（其浓度为原注射液的3.5倍）代替KCl溶液，结果复合物的生成亦被抑制55.4%。

表2　　广东蛇药与多种无机盐对神经毒与N-胆碱受体结合的抑制作用

膜制剂	药	物	n-AchR神经毒复合物生成被抑制的%
粗膜制剂	$CaCl_2$	$10^{-1}M$	40
〃	$MgCl_2$	$10^{-1}M$	39.4
〃	$MgAc_2$	$10^{-1}M$	38.3
溶性膜剂制	KCl	$10^{-2}M$	36
〃	〃	$10^{-1}M$	43.7
〃	〃	$5\times10^{-1}M$	66.2
〃	NaCl	$10^{-2}M$	20
〃	〃	$10^{-1}M$	23.4
〃	〃	$5\times10^{-1}M$	56
〃	LiCl	$10^{-1}M$	31
〃	神经毒	12.5μg	55.4
〃	广东蛇药注射剂	3.5x	55.6
〃	Ca^{++}、Mg^{++}、K^+、Na^+混合液		56.4

广东蛇药注射剂和该蛇药灰分光谱分析，除K^+外尚含有一定量的Ca^{++}、Mg^{++}、Na^+、Li^+等。我们亦分别用这些离子做实验，结果复合物的生成亦同样被抑制，其抑制率Ca^{++}和Mg^{++}基本相同（约40%被抑制）。K^+、Na^+、Li^+在相同的克分子浓度下，K^+的抑制作用较强。用$10^{-1}M$的$CaCl_2$，$MgCl_2$，KCl，NaCl、LiCl溶液各取等量混合后，然后取混合液的100μl作为顶替用的配基进行结合实验，结果抑制复合物的生成作用最为明显。按本实验的结果与无标记的神经毒12.5μg的抑制率相似。

讨　　论

神经递质Ach使化学敏感性的突触后膜去极化，并引起相应的效应（如肌肉收缩、电鱼电器官放电）。后膜的化学敏感性物质是亚细胞水平的n-AchR和离子通道。n-AhR的特殊功能是表现在它与Ach有专一性结合，并由此而导致细胞膜对阳离子的通透性增高，亦即由闭合型的通道转变为开放型通道。这种"结合——通道开放"偶联显然与受体的结构或结合点的构象改变有关。纯化后的受体蛋白虽然对Ach仍有反应和使离子的通透性增高的特性，但在膜组织上的n-AchR与游离受体是不同的，如电鳐（*T. califo-*

rnica) 的膜的n-AchR主要以二聚体的形式存在[6]，而该鱼的受体经纯化后是9S和13S的n-AchR的混合物（9S的为单聚体，13 S为二聚体）。二聚体还原后可得单聚体，单聚体在膜上可转化为二聚体[7]，但在去垢剂中则不行。因此，Karlin认为，在去垢剂中的受体未必能够充分说明离子通透性的调节机制。受体的功能正常地表现于磷脂膜上，这不仅对膜有依赖，可能磷脂对受体的结构亦有影响，故去垢剂溶解的受体与膜上的受体不能等同。Raftery[8]亦认为纯化后的受体与膜环境中的受体二者有一定的差异。本文一方面报道中国电鳐n-AchR的分离，另一方面利用分离所得的受体来研究广东蛇药解蛇毒的作用，为此，采用粗膜制剂和溶性膜制剂为材料进行研究，其效果可能更好。受体蛋白的生化特性容后发表。

用离心方法，无需蔗糖密度梯度也能制备含有大量n-AchR的膜制剂，该法简单易行。制备的膜制剂除了n-AchR外，用盐酸羟胺法证明它还含有丰富的胆碱酯酶，故膜制剂主要是突触后膜的组分，与天然存在的膜环境更为接近，有利于我们研究工作的进行。本工作的实验结果亦同样验证了中国电鳐的n-AchR与中华眼镜蛇神经毒有专一的、高亲和性的以及饱和结合的特性，这与国外许多实验室采用不同的鱼种的n-AchR所得的结果相符。实验结果亦表明标记神经毒与受体的结合反应在达到饱和结合之后，如标记神经毒的加入量过多时，结合的放射读数又会上升，这是粗膜制剂非受体蛋白的非特异性结合增多的缘故。这是采用粗膜制剂进行结合试验时的缺点。故需控制标记神经毒的加入量，避免非特异性结合过多的影响。从我们的实验亦表明烟碱样胆碱受体激动剂（如氨甲酰胆碱）和对抗剂（如筒箭毒碱）均能降低n-AchR与标记神经毒的结合率。故分离所得的受体也属于烟碱样的胆碱受体，与其他作者的看法一致。

以往已证明广东蛇药对一些蛇伤病人确有疗效，对实验性小白鼠蛇毒中毒有保护效应。广东蛇药对^{131}I-银环蛇在小鼠膈肌分布[9]有明显的抑制作用（整体实验与离体膈肌实验的P值均小于0.05及0.001）。本文利用广东蛇药注射剂对^{125}I-神经毒与n-AchR的结合反应亦有显著的抑制作用。从以上的疗效和实验结果不难使我们推想广东蛇药的抗蛇毒作用是通过抑制蛇毒与膈肌的胆碱受体相结合，从而解除或减轻蛇毒所引起呼吸麻痹的致死性。广东蛇药有效成分之一是钾盐，其中还带有少量的钠盐钙盐和镁盐。Raftery[10]等，Rubsaman[11]等和Mc Quarqie等[12]均已证明一价阳离子和二价阳离子均能抑制^{125}I-α-Bungarotoxin与电鱼的n-Ach的结合。如Raftery[10]所报道的一价阳离子（K^+、Na^+、Li^+、NH_4^+、Rb^+等）浓度约为$6\times10^{-3}M$，Mg^{++}在$2.9\times10^{-4}M$，Ca^{++}在$1.6\times10^{-4}M$下结合率被抑制50%。我们实验所用的浓度（$5\times10^{-1}\sim1\times10^{-2}M$）比上面作者所用的要高，可能与实验的条件和材料不同有关。由于广东蛇药注射剂对受体的结合反应也有抑制，其总成分的效应主要也是作用于受体而取得的。

n-AchR是一种糖蛋白，它由多个多肽链组成。这些糖蛋白已发现有两个结合点，其一是递质识别结合点，能与Ach和神经毒发生专一性结合，另一结合点与离子转运有关，能与一价及二价阳离子结合，这个结合点与阳离子结合后妨碍了神经毒与受体结合。这些离子的干扰现象，Jenkinson[13]在1960年已经提出过，以后许多作者[10~12]进一步验证。我们用火焰光度计和发射光谱分析，表明广东蛇药含有大量的K^+和少量的Na^+、Ca^{++}、Mg^{++}、Li^+，因此按我们实验结果表明其解毒作用，与它抑制^{125}I-神经毒

与膈肌n-AchR相结合似有一定的关系。至于广东蛇药的详细作用机理，今后再作进一步的报道。

参 考 文 献

〔1〕 Brady, R.N. *Receptors in Pharmacology*, 1978, p'123, Smythies, J.R. and Bradley, R.J. (ed.) Marcel Dekker.

〔2〕 云南省动物研究所：眼镜蛇毒神经毒及其针剂克痛宁鉴定会报告。（内部资料）。

〔3〕 Hartree, E.F. Determination of protein:a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 1972, 48, 422.

〔4〕 中山医学院：广东蛇药鉴定资料汇编，1977.

〔5〕 中山医学院：药理教研室实验资料，将发表。

〔6〕 Hamilton, S.L. et al. *Biochemistry*, 1978, 18, 155.

〔7〕 Karlin, A. et al. *Advances in Cytopharmacology*, 1979, 3, 183, Ceccarelli, B. and Clementi, F. (ed.), Raven Press.

〔8〕 Reed, K. et al. Characterization of acetylcholine receptor-rich and acetylcholinesterase-rich membrane particls from *Torpedo californica* Elecproplax. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, 167, 138.

〔9〕 吴秀荣等：广东蛇药对^{131}I-标记银环蛇毒在小鼠膈肌分布的影响，将发表。

〔10〕 Michaelson, D. et al Some molecular properties of an isolated acetylcholine receptor ion-translocation protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, 165, 796.

〔11〕 Rübsaman, M. et al. Rübsamen, H. et al. Characterization of the calcium-binding sites of the purified acetylcholine receptor and identification of the calicum-binding subunit. *Biochemistry*, 1978, 17, 3879.

〔12〕 Mc Quarqie, C. et al. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 6321.

〔13〕 Jenkinson, D.H. The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. *J. Physiol.*, 1960, 152, 309.

〔14〕 Lester, H.A. The response to acetylcholine. *Sci. Amer.*, 1977, 236 (2), 107.

志谢：本文同位素实验条件由本院放射医学同位素室大力协助在此谨致衷心谢意。

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTYLCHOLINE RECEPTOR RICH MEMBRANE FROM *NARCINE MACULATA*

Hu Ben-rong Shan pau-line Chen Ke-min Wu Xiu-rong
(Zhongshan Medical College)

Chang Shi-rong
(Peking Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

Binding of neurotoxin, labelled with ^{125}I has been studied in crude membrane preparation containing plenty of n-AchR from Narcine electric organ. Competition with a variety of receptor agonist and antagonist indicates that toxin binding exhibits the pattern expected nicotinic acetylcholine receptor. Membrane bound receptors appear to consist of at least two binding subunits, one for specific cholinergic ligands, and the other appears to preferentially bind to inorganic cations (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}). After binding with cations, the toxin binding is inhibited. Kwangtung Snake Drug also interferes with toxin-receptor interaction and the mechanism of interference has been discussed.